AMRESCO　Fluorescent DNA Quantitation Kit（1B1558-KIT）
取扱説明書

本製品はビスベンズイミド H33258 が 2 本差 DNA のマイナーな溝の AT 配列への結合による蛍光を利用しています。このキットを使うと、360nm の波長で励起を行い、460nm の蛍光波長を検出します。本製品は、dsDNA の量を 10ng/mL から最大 5ug/mL のレンジで定量することができます。サンプルに RNA やタンパク質が含まれていても、結果に影響しません。

【保存温度と安定性】

Fluorescent DNA standard と Fluorescent DNA　Dye は凍結保存（-20℃）が必要で、1 年安定です。凍結融解の繰り返しは避けてください。一度溶かした DNA 溶液は 2-8℃で数週間安定です。

Fluorescent DNA Assay Buffer, 10X は室温（18-25℃）で最大 2 年間安定です。

【キット内容】

Fluorescent DNA Assay Buffer, 10X 100mM Tris-HCl, pH7.4, 2M NaCl, 10mM EDTA	**200mL**
Fluorescent DNA Dye 10mg/mL bis Benzimide H33258	**250uL**
Fluorescent DNA Standard 1mg/mL　仔牛胸腺由来の DNA （in 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA）	**1mL**

2mL 反応系で 750 回実験可能です

【必要なもの】

・キュベットまたはマルチウェルプレート

・蛍光分光光度計

・脱イオン水

【使用方法】

はじめにお読みください

使用前に、Fluorescent DNA Assay Buffer, 10X を室温になじませておいてください

DNA の用意

DNA スタンダード溶液

1. 蛍光 DNA スタンダード（1mg/mL）を溶かします。凍結している場合には、50℃で 5-10 分加熱し、DNA が完全に解けたことを確認してください。
2. 蛍光 DNA スタンダードを滅菌したチューブとチップを使って希釈します。下の表に従ってください。
3. 蛍光 DNA スタンダード（1mg/mL）は-20℃で保存してください。凍結融解は 5 回以上繰り返さないでください。

Dye の用意

1. ビスベンズイミド　H332581 溶液を 0.1ug/mL と 1.0ug/mL の濃度で準備します。

内容	10ug/mL DNA Stock	100ug/mL DNA Stock
Fluorescent DNA Standard(1 mg/mL)	10 uL	100uL
Fluorescent DNA Assay Buffer, 10X	100 uL	100 uL
脱イオン水	890 uL	800 uL
トータル	1mL	1mL

2. 1mg/mL の蛍光色素を滅菌チューブと滅菌チップを使用して以下の表のように希釈します。
3. 調製した試薬は使用するまで遮光状態を保ってください。

内容	0.1ug/mL Fluorescent DNA Dye	1.0 ug/mL Fluorescent DNA Dye
Fluorescent DNA Assay Buffer, 10X	3 mL	3 mL
脱イオン水	27 mL	27 mL
Fluorescent DNA Dye (1mg/mL)	3 uL	30 uL
トータル	30mL	30mL

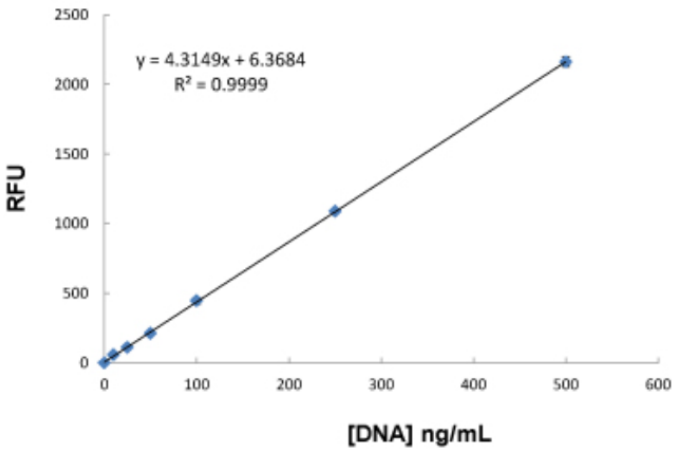
4. 上記表で調製した溶液（30mL）は 2mL アッセイ系を 15 回行うことができる量です。この量はスタンダードカーブ（7 点）と濃度未知のサンプル 8 サンプルに使用できる量です。

スタンダードカーブと濃度決定

・スタンダードカーブは濃度未知のサンプルの濃度を決定するために使用されます

・0.1 ug/mL 蛍光 DNA Dye は最大 500ug/mL の DNA に、1.0ug/mL の蛍光 DNA Dye は最大 5 ug/mL のサンプルにお使いいただけます。

1. 蛍光分光光度計を使用の 15-20 分前から電源を入れておきます。励起波長を 360nm に、蛍光波長を 460nm にセットします。
2. 調製した蛍光色素を用意します
3. 滅菌したチューブに1－7までラベルを書き込みます。チューブは 2mL 以上のものをご用意ください。また、濃度未知のサンプル数に合わせて、空の滅菌チューブをご用意ください。
4. 予想される DNA 濃度範囲に合わせて、ビスベンズイミド溶液　2mL をチューブにご用意ください。（巻末の表をご参照ください）
5. 適切な量の DNA サンプル量をそれぞれのチューブに加えます。（このとき、DNA サンプル量は 10uL を超えないようにしてください）ボルテックスでサンプルを撹拌します。
6. 1 つ目のサンプルは、DNA を含まずブランクです。励起波長 360nm、蛍光波長が 460nm であることを確認します。
7. キュベットを洗い、サンプル 2 を入れます。蛍光強度の数値をよみます。
8. Step 7 を繰り返し、すべてのスタンダードサンプルを測ります。
9. DNA 濃度と相対蛍光強度（relative fluorescence units RFU）をプロットし、スタンダードカーブを作成します。
10. 最小二乗法を用い、スタンダードカーブの 1 次方程式を決定し、未知の濃度のサンプルの相対蛍光強度から濃度を算出します。



スタンダードカーブの一例

方程式の y は RFU、x は DNA 濃度を示します。

DNA の濃度範囲: 10-500ng/mL				
Sample	0.1 ug/mL Fluorecent DNA Dye (mL)	10 ug/mL DNA Stock (uL)	100 ug/mL DNA Stock (uL)	Final DNA 濃度 (ng/mL)
1	2	0	-	0
2	2	2	-	10
3	2	5	-	25
4	2	10	-	50
5	2	-	2	100
6	2	-	5	250

DNA の濃度範囲: 100-5,000ng/mL (100ng/mL-5ug/mL)				
Sample	1.0 ug/mL Fluorecent DNA Dye (mL)	100 ug/mL DNA Stock (uL)	1.0 mg/mL DNA Stock (uL)	Final DNA 濃度 (ng/mL)
1	2	0	-	0
2	2	2	-	100
3	2	5	-	250
4	2	10	-	500
5	2	-	2	1,000
6	2	-	5	2,500
7	2	-	10	5,000

株式会社エムエステクノシステムズ

●大阪　電話 06-6396-6616

●東京　電話 03-3235-0673